

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-333420
(P2002-333420A)

(43) 公開日 平成14年11月22日 (2002. 11. 22)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
G 0 1 N 27/327		C 1 2 M 1/34	E 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/34		C 1 2 Q 1/00	B 4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/00		G 0 1 N 33/92	A 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/92		27/30	3 5 3 U
			3 5 3 B

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-57681(P2002-57681)
(22) 出願日 平成14年 3 月 4 日 (2002. 3. 4)
(31) 優先権主張番号 特願2001-63083(P2001-63083)
(32) 優先日 平成13年 3 月 7 日 (2001. 3. 7)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005821
松下電器産業株式会社
大阪府門真市大字門真1006番地
(72) 発明者 渡邊 基一
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内
(72) 発明者 長谷川 美和
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内
(74) 代理人 100072431
弁理士 石井 和郎 (外 1 名)

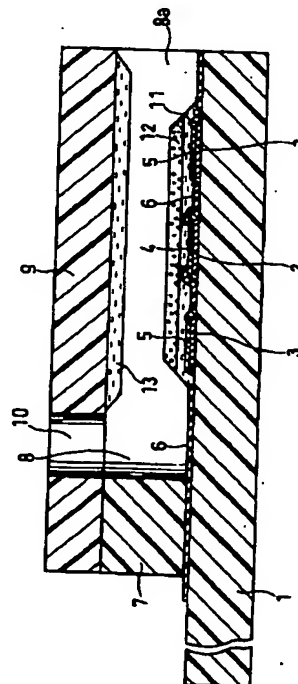
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサおよび基質の定量方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、高い応答性を有する、コレステロールを酸化する酵素およびコレステロールエステラーゼを含むバイオセンサを提供する。

【解決手段】 本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板、前記基板上に形成された測定極および対極を含む電極系、前記電極系上に形成された親水性高分子層、前記基板に組み合わされて基板との間に試料供給口から前記電極系に試料液を導く試料供給路を形成するカバー部材、および前記試料供給路内に設けられた試薬層を具備し、前記試薬層が、コレステロールを酸化する酵素、コレステロールエステラーゼ、電子メディエータ、および酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤を含む。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁性の基板、前記基板上に形成された測定極および対極を含む電極系、前記基板に組み合わされて基板との間に試料供給口から前記電極系に試料液を導く試料供給路を形成するカバー部材、および前記試料供給路内に設けられた試薬層を具備し、前記試薬層が、コレステロールを酸化する酵素、コレステロールエステラーゼ、電子メディエータ、および酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤を含むことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 前記緩衝剤が、コハク酸、コハク酸塩、クエン酸、クエン酸塩、フタル酸、フタル酸塩、マレイン酸、マレイン酸塩、リン酸、およびリン酸塩からなる群より選択される請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 前記緩衝剤がpH4～6.5の領域に緩衝能を有する請求項2記載のバイオセンサ。

【請求項4】 前記緩衝剤の量がセンサ1個当たり5～1000nmolである請求項3記載のバイオセンサ。

【請求項5】 前記緩衝剤の量がセンサ1個当たり20～500nmolである請求項4記載のバイオセンサ。

【請求項6】 前記コレステロールを酸化する酵素およびコレステロールエステラーゼと、前記電子メディエータとが互いに離れて前記試料供給路内に担持されている請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項7】 前記緩衝剤が、前記コレステロールを酸化する酵素またはコレステロールエステラーゼと混合して担持されている請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項8】 前記緩衝剤が、前記電子メディエータと混合して担持されている請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項9】 前記緩衝剤が、前記コレステロールを酸化する酵素、前記コレステロールエステラーゼおよび前記電子メディエータから離れて担持されており、かつ前記試料供給路内において、前記コレステロールを酸化する酵素、前記コレステロールエステラーゼおよび前記電子メディエータよりも前記試料供給口に近い位置に担持されている請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項10】 さらに前記試料供給路内にフィルターを有する請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項11】 前記フィルターが試料供給口に近い位置にある請求項10記載のバイオセンサ。

【請求項12】 前記フィルタが前記緩衝剤を担持している請求項10記載のバイオセンサ。

【請求項13】 前記コレステロールを酸化する酵素が、コレステロールオキシダーゼである請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項14】 測定対象が体液である請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項15】 前記体液が血液、血漿、リンパ液、または細胞間質液である請求項14記載のバイオセンサ。

【請求項16】 絶縁性の基板、前記基板上に形成され

た測定極および対極を含む電極系、前記基板に組み合わされて基板との間に試料供給口から前記電極系に試料液を導く試料供給路を形成するカバー部材、および前記試料供給路内に設けられた試薬層を具備し、前記試薬層が、コレステロールを酸化する酵素、コレステロールエステラーゼ、電子メディエータ、および酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤を含むバイオセンサ、並びに前記測定極と対極との間に電圧を印加する電圧印加手段および電圧を印加された前記測定極と対極との間に流れる電流を検知する電流検出手段を備えた測定システム。

【請求項17】 さらに前記電流検出手段の検知した電流または前記電流を変換した値を表示する表示部を有する請求項16記載の測定システム。

【請求項18】 絶縁性の基板、前記基板上に形成された測定極および対極を含む電極系、前記基板に組み合わされて基板との間に試料供給口から前記電極系に試料液を導く試料供給路を形成するカバー部材、および前記試料供給路内に設けられた試薬層を具備し、前記試薬層が、コレステロールを酸化する酵素、コレステロールエステラーゼ、および電子メディエータを含むバイオセンサを用いる基質の定量方法であって、酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤と測定試料とを混合する前処理工程、前記前処理工程がされた溶液を前記バイオセンサに供給する工程、および前記バイオセンサによって前記測定試料中の基質の定量を行う工程を含む基質の定量方法。

【請求項19】 酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤および酵素を含み、前記酵素が少なくともコレステロールを酸化する酵素およびコレステロールエステラーゼである酵素試薬。

【請求項20】 前記緩衝剤が、コハク酸、コハク酸塩、クエン酸、クエン酸塩、フタル酸、フタル酸塩、マレイン酸、マレイン酸塩、リン酸、およびリン酸塩からなる群より選択される請求項19記載の酵素試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中の特定成分を迅速かつ簡便に定量することができるバイオセンサ、および基質の定量方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来から、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく試料液中の特定成分を簡易に定量する方式として、様々なバイオセンサが提案されている。バイオセンサの一例として、例えば次のようなセンサが知られている（特開2000-39416号公報参照）。このバイオセンサは、絶縁性基板上にスクリーン印刷などの方法で測定極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して酸化酵素と電子メディエータを含む酵素反応層を形成したものである。

【0003】このバイオセンサの酵素反応層上に基質を

含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して酵素と基質が反応し、これにともなって電子メディエータが還元される。酵素反応終了後、還元された電子メディエータを電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めることができる。この従来のバイオセンサでは、血液、血漿、または血清等の試料液中のコレステロール濃度を測定するため、エステル型コレステロールを脱エステル化するコレステロールエステラーゼと、遊離型コレステロールを酸化するコレステロール酸化酵素であるコレステロールオキシダーゼの2種類の酵素を含む。しかしながら、血液、血漿、または血清等の測定試料は、中性付近にpH緩衝能を有するため、コレステロールを酸化する酵素およびコレステロールエステラーゼを含むバイオセンサにとって、必ずしも好ましいpH条件ではなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような問題点に鑑み、コレステロールを酸化する酵素およびコレステロールエステラーゼを含むバイオセンサの至適pHおよび好ましい緩衝剤を明確にして、高い応答性を有する高性能なバイオセンサを提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明によるバイオセンサは、絶縁性の基板、前記基板上に形成された測定極および対極を含む電極系、前記基板に組み合わされて基板との間に試料供給口から前記電極系に試料液を導く試料供給路を形成するカバー部材、および前記試料供給路内に設けられた試薬層を具備し、前記試薬層が、コレステロールを酸化する酵素、コレステロールエステラーゼ、電子メディエータ、および酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤を含む。

【0006】本発明による基質の定量方法は、絶縁性の基板、前記基板上に形成された測定極および対極を含む電極系、前記基板上に組み合わされて基板との間に試料供給口から前記電極系に試料液を導く試料供給路を形成するカバー部材、および前記試料供給路内に設けられた、コレステロールを酸化する酵素、コレステロールエステラーゼ、および電子メディエータを含む試薬層を具備するバイオセンサを用いる基質の定量方法であって、測定試料を、酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤と混合する前処理工程、前記前処理工程により得られた溶液を前記バイオセンサに供給する工程、および前記バイオセンサによって前記測定試料中の基質の定量を行う工程を含む。

【0007】本発明は、別の観点において、上記のバイオセンサ、並びに前記バイオセンサの測定極と対極との間に電圧を印加する電圧印加手段および電圧を印加された前記測定極と対極との間に流れる電流を検知する電流検出手段を備えた測定システムを提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明によるバイオセンサは、絶縁性の基板、前記基板上に形成された測定極および対極を含む電極系、前記基板に組み合わされて基板との間に試料供給口から前記電極系に試料液を導く試料供給路を形成するカバー部材、および前記試料供給路内に設けられた試薬層を具備し、前記試薬層が、コレステロールを酸化する酵素、コレステロールエステラーゼ、電子メディエータ、および酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤を含むことを特徴とする。ここで、前記電極系上には、親水性高分子層が形成されていることが好ましい。

【0009】本発明のバイオセンサは、試薬層が酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤を含んでいるから、測定試料液が中性付近に緩衝能を有する血液、血漿、または血清等である場合にも、試料に試薬層が溶解した反応系のpHは酸性領域に調整される。このため、酵素の反応性を向上させ、センサの応答性を向上することができる。また、反応系の基質濃度が高濃度であっても、一定時間内に十分な応答値が得られるので、測定時間が短縮できる。さらに、センサの応答性の向上に伴いS/N比が向上する、すなわち測定精度が向上する。また、試薬層が緩衝剤を含むと、溶液の展開および乾燥により形成される試薬層が平滑化される。試薬層をその試薬の水溶液からの乾燥により形成する場合、試薬の結晶の粗大化などにより試薬層が凹凸を有するものとなることがある。特に、電子メディエータのフェリシアン化カリウムを含むとき顕著である。試薬層が緩衝剤を含むとそのような凹凸を有しない、平滑な試薬層が得られる。その理由は、必ずしもここに述べる理論に拘束されるのを好むものではないが、緩衝剤はその溶液の乾燥により生成する結晶がより微細であるためと思われる。

【0010】センサに試料液を供給して試薬層を試料液に溶解する際、試薬層が凹凸を有すると、試料液と試薬層の凹凸部との間に空気が介在し、そのため試薬層を溶解した試料液中に気泡が生じることがある。試料液に気泡が生じると、試料供給路中を試料液がスムーズに移動できず、測定に支障を来すことがある。試薬層が平滑化されることにより、前記のような不都合を解消することができる。さらに試薬層が平滑化されるので、試料供給路内の体積または高さを減少することができ、試料液の微量化が実現される。

【0011】ここで緩衝剤が、コハク酸、コハク酸塩、D-酒石酸、クエン酸、クエン酸塩、フタル酸、フタル酸塩、trans-アクチニン酸、ギ酸、3,3-ジメチルグルタル酸、フェニル酢酸ナトリウム、酢酸、酢酸塩、カコジル酸ナトリウム、マレイン酸、マレイン酸塩、リン酸、リン酸塩、イミダゾール、2,4,6-トリメチルピリジン、トリエタノールアミン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(以下Trisで表す)、2-モルホリノエタンスルホン酸(以下MESで

表す)、N-(2-アセトアミド)イミノジアセト酢酸(以下ADAで表す)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(以下PIPESで表す)、N-2-(アセトアミド)-2-アミノエタノールスルホン酸(以下ACESで表す)、N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(以下BESで表す)、3-モルホリノプロパンスルホン酸(以下MOPSで表す)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(以下TESで表す)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(以下HEPESで表す)、およびクロロ酢酸からなる群より選択されることが好ましい。

【0012】これらの中で、溶解性が十分高いという観点から、コハク酸カリウム、コハク酸ナトリウム等のコハク酸塩、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸一水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等のリン酸塩、酢酸カリウム、酢酸ナトリウム等の酢酸塩、フタル酸水素カリウム、フタル酸ナトリウム、フタル酸カリウム等のフタル酸塩、マレイン酸水素ナトリウム、マレイン酸カリウム、マレイン酸ナトリウム等のマレイン酸塩が好ましい。これらコハク酸、コハク酸塩、リン酸、リン酸塩、マレイン酸、マレイン酸塩、フタル酸、フタル酸塩を用いると、特に応答値の向上が著しく、応答の直線性に優れたバイオセンサが得られる。さらに好ましくは、良好なバイオセンサ保存特性が得られるという点でコハク酸がよい。

【0013】上記の緩衝剤は、水に溶けやすいので、試料液を添加した際、緩衝剤を含む層は直ちに試料液に溶解し、酵素反応と電極反応を円滑に進めることができる。上記の緩衝剤は、必要に応じて塩酸、酢酸などの酸や、NaOH、KOHなどのアルカリによって、所定のpH領域に緩衝能を有するように調製してバイオセンサの試料供給路内に添加すればよい。応答の直線性の向上、および一定時間内において十分高い応答値を得るという観点から、好適なpHは、4~6.5である。さらに好ましいpHは、4~5.5である。

【0014】測定試料が緩衝作用を有する場合もあるため、2種類以上の緩衝剤をバイオセンサに添加してもよい。緩衝剤の組み合わせとしては、コハク酸とマレイン酸の混合物、コハク酸とリン酸の混合物、マレイン酸とTrisの混合物等が好ましい。上記緩衝剤の添加量は、試料液として血液0.04~20μlを測定対象とする使い捨てタイプのセンサでは、緩衝剤を含む層の効果的な平滑化、およびブランク値の低減化という観点から、センサ1個当たり5~1000nmolの範囲であることが好ましい。さらに、緩衝剤を含む試薬層の溶解性の向上およびブランク値の低減化という観点から、センサ1個当たり20~500nmolであることがより好ましい。ここで、ブランク値とは、基質濃度が0の測

定試料、例えば、水に対する応答値をいう。測定を迅速化するため、センサへ試料を供給してから応答値を得るまでの測定に要する時間を4分程度より短くするために好ましい酵素量は、センサ1個当たり、コレステロールエステラーゼが0.1~10U、コレステロールオキシダーゼが0.03~3Uである。

【0015】本発明の好ましい実施の形態において、前記コレステロールを酸化する酵素および前記コレステロールエステラーゼと、前記電子メディエータとが互いに離れて担持されている。この実施の形態によれば、ブランク値が低いバイオセンサが得られる。さらに、保存による応答値増加が防止されるので、保存特性に優れたバイオセンサが得られる。本発明の他の好ましい実施の形態において、前記緩衝剤が、前記コレステロールを酸化する酵素またはコレステロールエステラーゼと混合して担持されている。この実施の形態によれば、コレステロールを酸化する酵素またはコレステロールエステラーゼを含む層が平滑化されるので、測定試料をセンサに供給する時に、気泡が混入することを防ぐことができる。

【0016】本発明のさらに他の好ましい実施の形態において、前記緩衝剤が、前記電子メディエータと混合して担持されている。この実施の形態によれば、電子メディエータを含む層が平滑化されるので、測定試料供給時に気泡が混入することを防ぐことができる。本発明の好ましい実施の形態において、前記緩衝剤が、前記コレステロールを酸化する酵素、前記コレステロールエステラーゼおよび前記電子メディエータから離れて担持されており、かつ前記試料供給路内において、前記コレステロールを酸化する酵素、前記コレステロールエステラーゼおよび前記電子メディエータよりも前記試料供給口に近い位置に担持されている。この実施の形態によれば、バイオセンサに供給された測定試料は、まず緩衝剤を溶解することで、測定試料のpHがすみやかに酸性側に調整されるという効果を有する。

【0017】本発明の他の好ましい実施の形態において、さらに前記試料供給路内にフィルターを有する。試料として血液を用いたとき、このフィルタにより、血球成分が濾過され、血球成分が電極に対して与える影響を防ぐことができる。前記フィルタが、試料供給路内において、試料供給口に近い位置にあると、試料から血球成分をより効果的に除去できるので、より好ましい。前記フィルタが、試料供給路のうち試料供給口に近い位置にセットされていると、試料として血液を用いたときに、酵素や電子メディエータなどの試薬や電極へ血球成分が接触することをより効果的に防止することができる。フィルタとしては、ガラスフィルタ、濾紙、セルロース繊維等が用いられる。

【0018】本発明のバイオセンサが測定する対象としては、体液が挙げられる。体液としては、血液、血漿、血清、リンパ液、細胞間質液、汗のいずれかが挙げられ

る。特に、血液、血漿、および血清に含まれるコレステロールの一部は、脂肪酸が結合したコレステロールエステルとして存在している。本発明のバイオセンサは、コレステロールエステラーゼを含み、その触媒作用によって、コレステロールエステルを遊離型のコレステロールに変換し、これをコレステロールオキシダーゼ等により酸化する。

【0019】本発明は、別の観点において、上記のバイオセンサ、並びに前記バイオセンサの測定極と対極との間に電圧を印加する電圧印加手段および電圧を印加された前記測定極と対極との間に流れる電流を検出する電流検出手段を備えた測定システムを提供する。本発明の好ましい測定システムは、さらに前記電流検出手段の検出した電流または前記電流を例えばコレステロール値に変換した値を表示する表示部を有する。

【0020】本発明は、さらに、絶縁性の基板、前記基板上に形成された測定極および対極を含む電極系、前記電極系上に形成された親水性高分子層、前記基板に組み合わされて基板との間に試料供給口から前記電極系に試料液を導く試料供給路を形成するカバー部材、および前記試料供給路内に設けられた試薬層を具備し、前記試薬層が、コレステロールを酸化する酵素、コレステロールエステラーゼ、および電子メディエータを含むバイオセンサを用いる基質の定量方法であって、酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤と測定試料とを混合する前処理工程、前記前処理工程がされた溶液を前記バイオセンサに供給する工程、および前記バイオセンサによって前記測定試料中の基質の定量を行う工程を含む基質の定量方法を提供する。この方法によると、前処理工程によって、測定試料のpHがすみやかに酸性側に調整されるので、酵素の反応性を向上し、センサの応答性を向上することができる。

【0021】本発明は、酸性のpH領域に緩衝能を有する緩衝剤および酵素を含み、前記酵素が少なくともコレステロールを酸化する酵素およびコレステロールエステラーゼである酵素試薬を提供する。この酵素試薬をバイオセンサに添加するだけで、応答性が向上したバイオセンサが得られる。本発明においてコレステロールを酸化する酵素としては、コレステロールオキシダーゼおよびコレステロールデヒドロゲナーゼが挙げられる。電子メディエータとしては、フェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノンおよびその誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体などを用いることができる。中でも、空気中において安定な酸化還元を行うことができるフェリシアン化カリウムが好ましい。

【0022】親水性高分子は、電極系表面または基板表面から、コレステロールを酸化する酵素、コレステロールエステラーゼ、電子メディエータ、緩衝剤等の試薬を含む試薬層の剥離を防ぐことができる。さらに、親水性

高分子は、前記試薬層表面の割れを防ぐ効果も有しており、バイオセンサの信頼性を高めるのに効果的である。このような親水性高分子としては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジンなどのポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸またはその塩の重合体、メタクリル酸またはその塩の重合体、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸またはその塩の重合体、アガロースゲルおよびその誘導体があげられる。特に、十分な粘度が得られることから、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、およびポリビニルピロリドンが好ましい。

【0023】本発明は、微量の試料量で精度の高い測定値の得られるバイオセンサを提供することをも意図している。そのような目的には、後述のような構造のセンサが適する。特に、試料供給口から空気孔に至る試料供給路のサイズを、幅0.4~4mm、高さ0.05~0.5mm、長さ2~10mmとするのが好ましい。さらに好ましいセンサは、試料供給路のサイズが、幅0.5~2mm、高さ0.05~0.2mm、長さ3~5mmであり、試料量は0.075~2 μ lとなる。以下に、実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

【0024】

【実施例】《実施例1》図1は、本発明のバイオセンサにおいて酸性溶液を与える緩衝剤を用いることの効果を実証するために用いた、バイオセンサの斜視図を示す。ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード2および3を形成している。ついで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して測定極4を形成している。この測定極4は、リード2と接触している。さらに、この基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成している。絶縁層6は、測定極4の外周部を覆っており、これにより測定極4の露出部分の面積を一定に保っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように基板1上に印刷してリング状の対極5を形成している。測定極4および対極5から電極系が形成される。

【0025】コレステロールを酸化する酵素およびコレステロールエステラーゼを用いたバイオセンサの至適pH、および好ましい緩衝剤を明確にするため、上記バイオセンサを用いて以下の実験を行った。まず、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、および1種類の緩衝剤を含む水溶液を調製した。次に、フェリシアン化カリウム、およびTriton X-100

を含む水溶液を調製した。測定試料としてヒト血清を用いた。緩衝剤は、コハク酸、マレイン酸、リン酸、およびTritonの中から1種類選択した。コレステロール濃度0mg/mlに対する応答値を得るためには、ヒト血清の代わりに水を用いた。上記3種の溶液をチューブ内で攪拌、混合した。得られた混合溶液中の各試薬および測定対象のコレステロールの濃度は次のとおりである。

【0026】コレステロールエステラーゼ：200ユニット(U)/ml

コレステロールオキシダーゼ：1000U/ml

緩衝剤：100mM

フェリシアン化カリウム：300mM

Triton X-100：2wt%

コレステロール：0~116mg/dl

【0027】前記の混合された溶液中では、血清に含まれるエステル型コレステロールは、コレステロールエステラーゼによって、脱エステル化される。この脱エステル化されたコレステロール、および初めから血清に含まれているコレステロールは、コレステロールオキシダーゼによって酸化される。同時に、溶液中のフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。

【0028】次に、上記の混合液を図1に示す電極系上に10μl(マイクロリットル)滴下した。3種の溶液を混合してから20秒後に、対極を基準として測定極に500mVの電圧を印加した。このとき、溶液に含まれるフェロシアン化イオンが酸化され、測定極と対極の間に電流が流れる。電圧を印加して5秒後に測定極および対極間を流れる電流値を測定した。最後に、血清が緩衝能を有するため、混合溶液のpHを実測した。緩衝剤の一例としてマレイン酸を用い、種々の総コレステロール濃度に調製された混合溶液の応答電流値を測定した。横軸に混合溶液の総コレステロール濃度、縦軸に応答電流値をプロットしてセンサの応答特性図を作成した。それを図2に示す。その結果、溶液のpHが酸性領域にある場合に、より応答値が高く、よりよい応答の直線性が得られた。また、pHが酸性領域にある場合、一定時間内に応答の直線性が得られることから、酸性の緩衝剤の添加によって、測定時間の短縮を実現できた。

【0029】次に、緩衝剤としてコハク酸を用いた場合のセンサの応答特性図を図3に示す。その結果、pH4または5のいずれの場合にも応答値が高く、よりよい応答の直線性が得られた。また、応答直線の傾き向上によるS/N比向上、すなわち測定精度の向上が望める。コハク酸、マレイン酸、リン酸、およびTritonをそれぞれ緩衝剤に用いたときの結果を図4に示す。この図からセンサのpH依存性が明らかである。混合液のpHを酸性領域に調製した場合に、より高い応答値が得られることが明らかになった。一方、混合液のpHを8より高かった場合は、ブランク応答(コレステロール0mg/dlに対する電流応答値)が高いことが明らかとなり、不

適であった。最適なpHは、4~6.5であり、さらに好ましくは、4~5.5であった。この実験で用いた酵素の至適pHは、コレステロールエステラーゼがpH6.5以下、コレステロールオキシダーゼがpH7付近であった。よって、これらの結果は、コレステロールエステラーゼの至適pHにより近いpHに、試料液のpHを調節することで、より高い応答値が得られることを示している。

【0030】《実施例2》図5および図6を用いて本実施例を説明する。図5は、本実施例におけるバイオセンサの試薬層を除いた分解斜視図であり、図6はその縦断面図である。基板1は、図1と同様の電極系を有する。この基板に組み合わせるカバー部材は、スリット8を有するスペーサ7、および空気孔10を有するカバー9からなる。後述のように各試薬層を形成した後、図5の一点鎖線で示すような位置関係をもって、基板1にスペーサ7およびカバー9を接着することにより、バイオセンサが組み立てられる。このバイオセンサは、スペーサ7のスリット8の部分に試料供給路が形成される。センサの端部におけるスリット8の開放端部8aは、試料供給路への試料供給口となる。ここに用いた基板1のサイズは、幅6mm、長さ30mmである。試料供給口から空気孔に至る試料供給路の内容積のサイズは、幅2.0mm、高さ0.1mm、長さ5.0mmである。

【0031】電極系を形成した基板1上に、親水性高分子の一種であるカルボキシメチルセルロース(以下CMCで表す)の0.5wt%水溶液を4μl滴下し、50℃で15分間乾燥することによりCMC層11を形成した。次いで、このCMC層11上に、緩衝剤の一種であるコハク酸、および電子メディエータの一種であるフェリシアン化カリウムを含む電子メディエータ・緩衝剤層12を形成した。電子メディエータ・緩衝剤層12の作製方法は、以下の通りである。まず、pH5に調製したコハク酸濃度20mMの緩衝液に、フェリシアン化カリウムを75mMとなる量を添加し、溶解した。次に、このフェリシアン化カリウムを含むコハク酸緩衝液を、CMC層11上に4μl滴下した後、50℃において15分間乾燥した。

【0032】一方、スペーサ7とカバー9を張り合わせたカバー部材における試料供給路となるスリット8に面するカバー9側には、コレステロールエステラーゼ900U/ml、コレステロールオキシダーゼ400U/ml、並びに界面活性剤としてTriton X-100を1.6wt%およびコール酸ナトリウムを30mM含む水溶液0.5μlを滴下し、凍結乾燥することで、酵素・界面活性剤層13を形成した。酵素・界面活性剤層13を形成したカバー部材と、CMC層11および電子メディエータ・緩衝剤層12を形成した基板1とを張り合わせてバイオセンサが完成する。

【0033】測定試料がセンサ内に導入されると、電子

メディエータ・緩衝剤層12に含まれるコハク酸が溶解して、センサ内の溶液のpHを酸性側に調製する。そのため、酵素の活性が向上して、センサの応答性が向上する効果が得られる。そして、一定時間内に十分な応答が得られるので、測定時間が短縮されるという効果が得られる。また、電子メディエータ・緩衝剤層12に含まれるコハク酸が、層12自体を平滑化するので、電極系上への気泡の混入を防止するという効果が得られる。さらに、酵素と電子メディエータとが互いに離れて担持されているので、ブランク値が低いバイオセンサが得られる。酵素と電子メディエータとが互いに離れて担持されているので、保存特性に優れたバイオセンサが得られる。すなわち、保存後のバイオセンサにおいても作製直後のバイオセンサと同等の応答値を示し、ブランク値の増加その他により保存後の応答値が不当に増加するのが抑制される。

【0034】バイオセンサ内における酵素、またはフェリシアン化カリウムは、本発明の効果を損なわない限り、種々の位置に配置することができる。例えば、フェリシアン化カリウムは、試料供給路内のCMC層上以外の場所にも配置することができる。本実施例では、界面活性剤としてTriton X-100およびコール酸ナトリウムを用いたが、他のオクチルチオグルコシド、Lubrol、コール酸、デオキシコール酸ナトリウム、ジギトニン、ドデシルマルトシド、シュクロースモノラウレート、タウロデオキシコール酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-p-オクチルフェニルエーテル等の界面活性剤を用いてもよい。酵素反応に伴い還元された電子メディエータを酸化する電流の測定方法としては、測定極と対極のみの二電極方式と、さらに参照極を加えた三電極方式の両方の方式が可能である。

【0035】《実施例3》本実施例のバイオセンサを図7に示す。まず、基板1上に、実施例2と同様にして、CMC層11を形成した。次に、pH5に調製したマレイン酸緩衝液に、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、フェリシアン化カリウム、Triton X-100、およびコール酸ナトリウムを加えた水溶液を調製した。この水溶液中の各試薬の濃度は、マレイン酸：200mM、コレステロールエステラーゼ：900U/ml、コレステロールオキシダーゼ：400U/ml、フェリシアン化カリウム：600mM、Triton X-100：1.6wt%、コール酸ナトリウム：30mMである。この水溶液をCMC層11上に0.5μl滴下して凍結乾燥することで酵素・界面活性剤・電子メディエータ・緩衝剤層14を形成した。

【0036】本実施例では、CMC以外の全ての試薬を一度に滴下し乾燥するので、作製方法が最も容易であるという利点を有する。また、測定試料がセンサ内に導入されると、酵素・界面活性剤・電子メディエータ・緩衝剤層14に含まれるマレイン酸が溶解して、センサ内の

溶液のpHを酸性側に調製する。そのため、酵素の活性が向上して、センサの応答性が向上する効果が得られる。

【0037】《実施例4》本実施例のバイオセンサを図8に示す。電極系を形成した基板1上に、実施例2と同様にして、CMC層11を形成した。次いで、CMC層11上に、Triton X-100を0.16wt%、コール酸ナトリウムを3mM、およびフェリシアン化カリウムを75mM含む水溶液を5μl滴下した後、50℃において15分間乾燥して、界面活性剤・電子メディエータ層15を形成した。一方、試料供給路内のカバー9側には、コレステロールエステラーゼ900U/ml、コレステロールオキシダーゼ400U/ml、および緩衝剤の一種であるリン酸を20mM含む水溶液を0.5μl滴下した後凍結乾燥することで酵素・緩衝剤層16を形成した。

【0038】測定試料がセンサ内に導入されると、酵素・緩衝剤層16に含まれるリン酸が溶解して、センサ内の溶液のpHを酸性側に調製する。そのため、酵素の活性が向上して、センサの応答性が向上する効果が得られる。また、酵素・緩衝剤層16に含まれるリン酸が、層16自体を平滑化するので、電極系上への気泡の混入を防止するという効果が得られる。さらに、酵素と電子メディエータとが互いに離れて担持されているので、ブランク値が低く、保存による応答値増加が防止され、保存特性に優れたバイオセンサが得られる。

【0039】《実施例5》図9および図10を用いて、本実施例を説明する。図9は本実施例におけるバイオセンサの試薬層を除いた分解斜視図であり、図10は同バイオセンサの縦断面図である。基板21は、実施例1と同様にして、リード22に接続された測定極24、リード23に接続された対極25および絶縁層26を有する。基板21上に電極系を覆うように、実施例2と同様にして、CMC層32を形成した。次いで、CMC層32上に、フェリシアン化カリウムの75mM水溶液を5μl滴下した後、50℃において15分間乾燥し、電子メディエータ層33を形成した。

【0040】一方、スペーサ27とカバー29を張り合わせたカバー部材側には、試料供給路内のカバー29に、コレステロールエステラーゼ900U/ml、コレステロールオキシダーゼ400U/ml、並びに界面活性剤としてTriton X-100を1.6wt%およびコール酸ナトリウムを30mM含む水溶液を0.5μl滴下した後凍結乾燥することで酵素・界面活性剤層34を形成した。さらに、試料供給路内において、酵素・界面活性剤層34の上流には、測定試料に含まれる固体成分を濾過するためのフィルタ31を設けた。

【0041】フィルタ31は、例えば、測定試料が血液である場合には、その血球を濾過し、血球成分が電極に対して与える影響を防ぐ役割を果たす。図10のよう

に、試料供給路において、フィルタ31が試料供給口に近い位置にあると、試料から血球成分をより効果的に除去できるので、好ましい。フィルタ31が、試料供給路のうち試料供給口に近い位置にセットされると、試料として血液を用いたときに、電子メディエータ層33、酵素・界面活性剤層34や電極へ、血球成分が接触することをより効果的に防止することができる。フィルタとしては、ガラスフィルタ、濾紙、セルロース繊維等の三次元的に連なる多孔体が用いられる。この多孔体は、毛管作用により血液を電極系側へ移動させるが、血漿と血球との流通抵抗の差により血球を濾過する作用を有する。

【0042】基板21、スペーサ27、およびカバー29を一点鎖線で示す位置関係で接着した際に、フィルタ31は基板21の表面と31'の部分において接する。基板21上のセンサ端部21aは、試料供給路への試料供給口となる。ここに供給された試料は、フィルタ31に吸収され、毛管作用により電極系へ移動する。緩衝剤であるコハク酸は、酵素・界面活性剤層34および電子メディエータ層33より上流側に位置するフィルタ31内に含有させた。コハク酸の含有方法としては、フィルタ31を所定の位置に配置した後、コハク酸の水溶液をフィルタ31に滴下して、凍結乾燥する方法によった。

【0043】本実施例では、試料供給路内において、コハク酸が、酵素およびフェリシアン化カリウムより上流に位置するので、測定試料がまずコハク酸を溶解することで、測定試料のpHが速やかに酸性側に調整される。そのため、バイオセンサ内における酵素の活性が向上して、センサの応答性が向上する効果が得られる。

【0044】《実施例6》図11は、本発明の一実施例における測定システムの回路構成を示すブロック図である。測定装置40は、バイオセンサ41の測定極のリード42と対極のリード43とを通して両電極間に制御された電圧を印加する電圧印加装置44およびセンサの測定極と対極間に流れる電流を測定する電流測定器45を有する。測定された電流値は、表示部46に表示される。表示部46は、測定された電流値を例えばコレステロールに換算して表示することもある。

【0045】

【発明の効果】以上のように本発明によれば、緩衝剤を添加してバイオセンサ内の反応系のpHを酸性領域に調整することで、バイオセンサの応答値を向上することが

でき、より良好な応答の直線性が得られる。また、一定時間内に十分高い応答値が得られることから、測定時間の短縮を実現することができる。さらに、緩衝剤がこれを含む試薬層を平滑化するので、測定試料を供給した時に、気泡が混入することを防ぐことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のバイオセンサにおいて緩衝剤を用いることの効果を実証するために用いた、バイオセンサの斜視図である。

【図2】同バイオセンサにおいて緩衝剤としてマレイン酸を用いた場合の応答特性を示す図である。

【図3】同バイオセンサにおいて緩衝剤としてコハク酸を用いた場合の応答特性を示す図である。

【図4】同バイオセンサにおいて各種緩衝剤を用いた場合の応答特性を示す図である。

【図5】本発明の一実施例におけるバイオセンサの試薬層を除いた分解斜視図である。

【図6】同バイオセンサの縦断面図である。

【図7】本発明の他の実施例におけるバイオセンサの縦断面図である。

【図8】本発明のさらに他の実施例におけるバイオセンサの縦断面図である。

【図9】本発明のさらに他の実施例におけるバイオセンサの試薬層を除いた分解斜視図である。

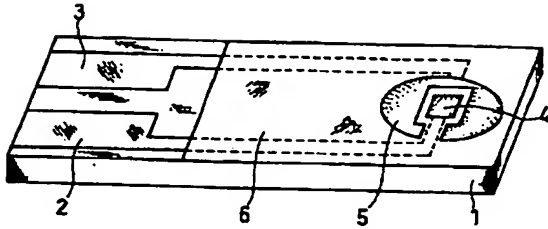
【図10】同バイオセンサの縦断面図である。

【図11】本発明の実施例における測定システムの回路構成を示すブロック図である。

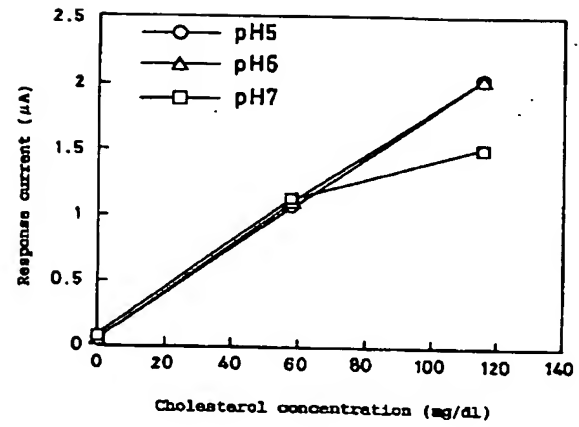
【符号の説明】

- 1 基板
- 2、3 リード
- 4 測定極
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 スペーサ
- 8 スリット
- 9 カバー
- 10 空気孔
- 11 CMC層
- 12 電子メディエータ・緩衝剤層
- 13 酵素・界面活性剤層

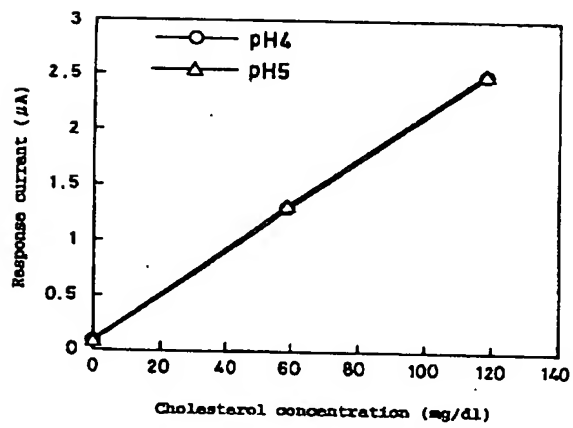
【図1】



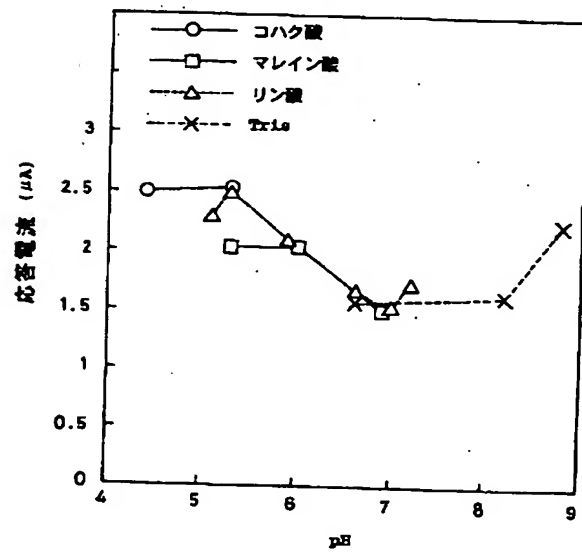
【図2】



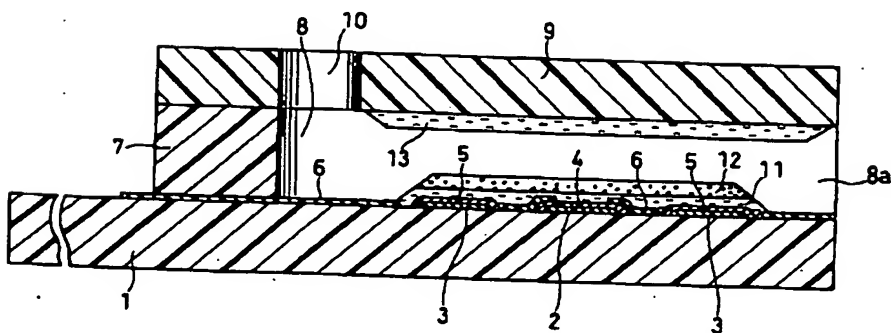
【図3】



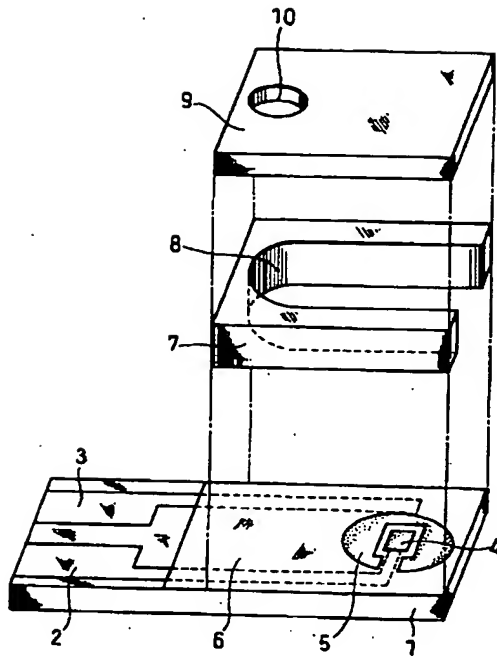
【図4】



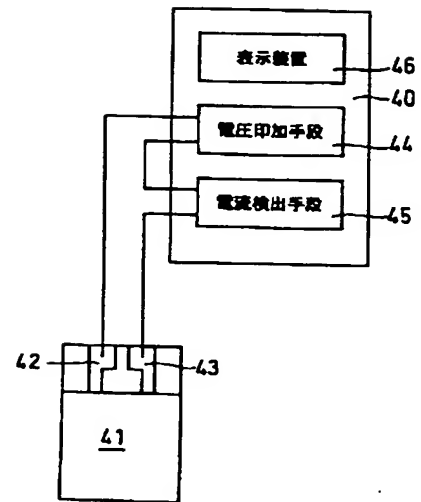
【図6】



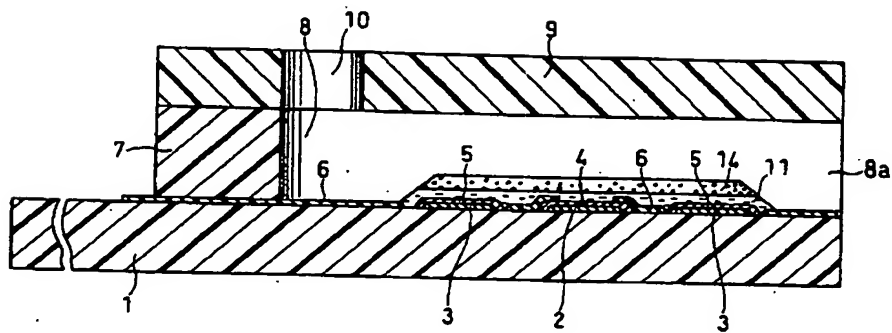
【図 5】



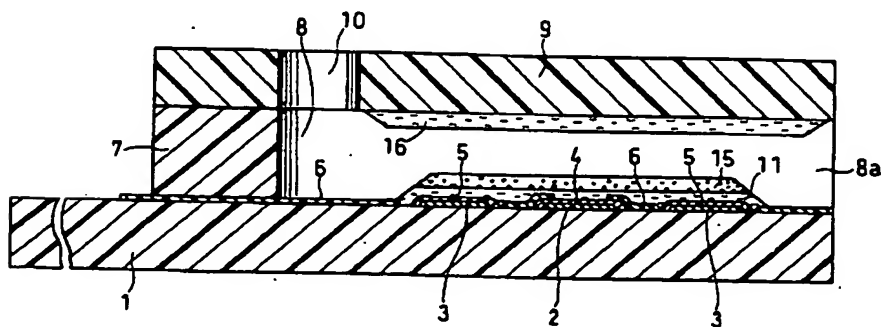
【図 11】



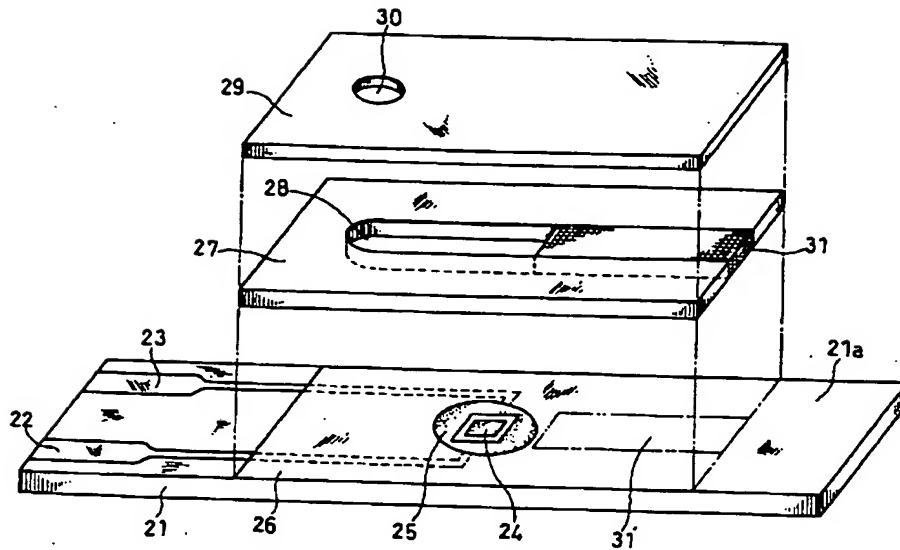
【図 7】



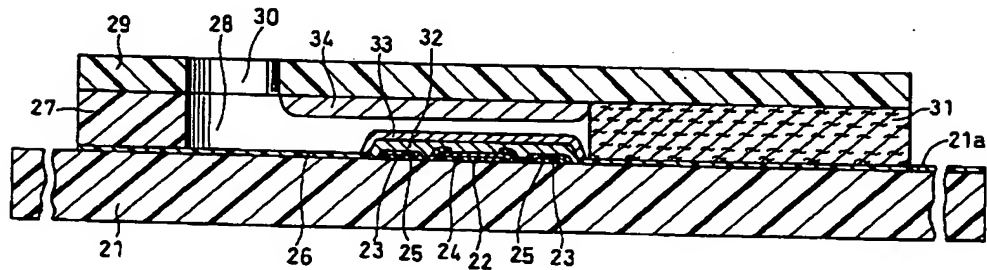
【図 8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I
G 0 1 N 27/30

テ-マ-ト' (参考)

3 5 3 P
3 5 3 R

(72) 発明者 山本 智浩
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内
(72) 発明者 吉岡 俊彦
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内
(72) 発明者 南海 史朗
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

F タ-ム (参考) 2G045 AA13 BA01 BB05 BB52 CA25
CA26 CA30 DA69 FB01 FB05
GC20 HA01
4B029 AA07 AA21 BB20 CC01 CC03
CC08 FA12
4B063 QA01 QQ03 QQ76 QR03 QR12
QR50 QR51 QR52 QR85 QS39
QX04